

EKSPRESI SPERMATOGENESIS TIKUS PUTIH SETELAH INDUKSI DENGAN PROTEIN INSULIN LIKE GROWTH FACTOR-I COMPLEX PLASMA SEMINALIS KAMBING

Suherni Susilowati

Departemen Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus C unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115
E-mail: herni_fkh@unair.ac.id

ABSTRACT

The objective of this research was to analyzed the expression of spermatogenesis on white rat after induced by Insulin Like Growth Factor – I (IGF-I) Complex protein from goat seminal plasm. This research consisted of two phase. The first phase was explorative laboratory experiment concerned with identification, isolation and spesification IGF-I Complex by using gel Native Polyacrylamid gel electrophoresis, electroelution and Western Blot. Result of gel Native PAGE indicated that of goat seminal plasm with Comassie Blue Stain consisted of seven bands. Result of Western Blot indicated that molecule of IGF-I Complex of goat seminal plasm to bound specific with anti IGF-I Complex at protein ribbon. The second phase concerned with expretion of spermatogenesis on white rat after induction with isolat of IGF-I Complex protein. Result of the expression spermatogenesis on white rat after induction IGF-I Complex to show the significant different between three groups ($p < 0.05$). From result above can be concluded that IGF-I Complex protein can increase the total of spermatocyte I and spermatocyte II.

Key words: goat seminal plasm, IGF-I Complex, spermatogenesis

PENGANTAR

Growth factor adalah polipeptida yang bekerja sebagai pengatur sistem parakrin, autokrin dan endokrin pada pertumbuhan dan diferensiasi sel (Clenmons dan Jone, 1995). Salah satu *growth factor* tersebut adalah *Insulin Like Growth Factor-I* (IGF-I) Complex. *IGF-I Complex* merupakan protein yang terdiri atas kombinasi molekul *acid label subunit* (ALS) dengan berat molekul 53 kDa, *Insulin Like Growth Factor Binding Protein* (IGFBP) dengan berat molekul 85 kDa dan *Insulin Like Growth Factor* (IGF) dengan berat molekul 7,6 kDa yang membentuk kompleks (Baxter, 1990). Kompleks IGF dan IGFBP merupakan glikoprotein (Baxter, 1990). Glikoprotein adalah protein yang mengandung karbohidrat (oligosakarida) yang terikat secara kovalen pada polipeptida *backbones* (Harper, 1988). IGFBP merupakan suatu *growth hormone dependent* yang mempunyai afinitas yang tinggi dan dapat berfungsi sebagai inhibitor ataupun aktivator sintesis IGF-I (Kostecha dan Blanovec, 1999; Anastasia *et al.*, 2000).

Pada spesies primata tingkat tinggi, kompleks protein IGF tersebut ditemukan di cairan amnion, cairan cerebrospinal dan plasma seminalis (Baxter, 1990). *IGF-I Complex* dengan berat molekul 150 kDa juga ditemukan di dalam plasma seminalis kelinci yang memengaruhi fungsi sperma (Minelli *et al.*, 2001). Pada manusia, IGF-I plasma seminalis penting untuk perkembangan sel germinatif yang

dikontrol oleh konsentrasi *growth hormone* (GH) yang memengaruhi proliferasi dan diferensiasi. Konsentrasi IGF-I pada plasma seminalis manusia berhubungan dengan kualitas semen, konsentrasi *growth hormone*, testosteron, IGFBP 3, placentar protein 14 (PP14) *reseptor fibronectin*, *prostate Specific Antigen* (PSA), *luteinizing hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH) (Glander *et al.*, 1996).

IGF-I disekresi oleh beberapa jaringan terutama di hati dan ditransformasikan ke jaringan lain bertindak sebagai hormon endokrin. Di dalam plasma semen IGF-I telah diidentifikasi di dalam testis yang disekresi oleh sel leydig dan sel sertoli (Roser dan Hess, 2001). IGF-I yang disekresi dalam plasma seminalis diproduksi oleh sel-sel sertoli dan tidak dapat melalui *blood testis barrier*, dalam hal ini bertindak sebagai parakrin yang berpengaruh terhadap perubahan epitel germinalis sampai menjadi spermatosit. Reseptor IGF-I telah diidentifikasi pada sel sertoli, sel leydig, spermatosit II, spermatid dan spermatozoa (Balboni *et al.*, 1988; Macpherson *et al.*, 2002). *IGF-I* selain berfungsi pada proses spermatogenesis juga berfungsi pada proses steroidogenesis (Macpherson *et al.*, 2002) dengan bertambahnya ekspresi reseptor LH/HCG (Donald *et al.*, 1998). IGF mampu mengaktivasi sel-sel steroidogenik sehingga akan mempunyai potensi terhadap *Adrenocortico Tropic Hormone* (ACTH) pada

sel adrenal, FSH pada sel granulosa, LH dari sel teka dan LH pada sel leydig (Donald's, 2003). Pada manusia telah diteliti, terdapat korelasi positif antara *IGF-I* plasma seminalis dengan kualitas semen (Birkenmeier *et al.*, 1996). Penelitian mengenai *Insulin Like Growth Factor* memang banyak dilakukan tetapi peneliti ingin melakukan penelitian mengenai gambaran testis tikus putih setelah induksi dengan protein *IGF-I Complex* plasma seminalis kambing.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui peran *IGF-I Complex* plasma seminalis kambing terhadap ekspresi spermatogenesis tikus putih. Adapun manfaat penelitian ini adalah untuk memperbaiki fertilitas pada hewan jantan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan penelitian berupa kambing jantan peranakan ettawa sebanyak 6 ekor yang digunakan untuk memperoleh sampel. Selain itu juga digunakan bahan-bahan untuk isolasi dan purifikasi protein. *Non-Reducing Sample Buffer* (Non-RSB), *separating gel* 12%, *stacking gel*, *marker high range SDS-PAGE standards* (Bio-Rad), *Comassie Blue* (Bio-Rad), larutan destaining, membran nitrocellulose dan anti-*IGF-I Complex*.

Alat-alat yang diperlukan pada penelitian ini meliputi vagina buatan, tabung skala, sentrifus dingin, gelas Becker, Erlenmeyer, Mikropipet, tabung Eppendorf, seperangkat alat gel elektroforesis horizontal, alat elektroelusi, gelas benda dan gelas penutup.

Penelitian ini diawali dengan penelitian eksplorasi laboratorik, terdiri atas preparasi plasma seminalis kambing, *Native Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (Native-PAGE) plasma seminalis kambing untuk identifikasi fraksi protein, elektroelusi untuk isolasi protein *IGF-I Complex*, spesifisitas protein dengan *Western Blot*. Selanjutnya isolat protein *IGF-I Complex* yang telah dielusi dilakukan induksi pada tikus putih jantan.

Koleksi Semen dan Purifikasi Protein

Semen ditampung dari kambing jantan peranakan ettawa dengan menggunakan vagina buatan. Semen tersebut ditambah dengan PBS kemudian disentrifus pada suhu 5° C dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, kemudian supernatannya (plasma semen) diambil dengan mikropipet dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf. Purifikasi dilakukan dengan cara menambahkan *phosphat buffer saline* (PBS) dan *phenylmethenesulfonyl fluoride* (PMSF) kemudian divortex selama 5 menit, disonikator selama 10 menit pada suhu 4° C kemudian divortex lagi dan disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatannya diambil ditambah dengan etanol absolut

dengan perbandingan 1:1 dan diendapkan semalam (sampai tidak bau etanol), etanolnya dibuang kemudian peletnya ditambah dengan Tris Cl dengan 1–2 kali volume pellet (Aulani'am, 2005).

Identifikasi Protein *Insulin Like Growth Factor-I Complex* dengan Metode *Native-PAGE*

Gel dibuat dua lapis, yaitu gel sebagai tempat pengumpulan sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*). *Separating gel* di masukkan ke dalam *plate* menggunakan mikropipet, permukaan dilapisi dengan menambahkan akuades dan dibiarkan 10–30 menit hingga terbentuk gel. Selanjutnya *stacking gel* dituangkan di atas *separating gel* yang telah memadat, setelah itu dipasang sisir untuk membentuk sumuran dan didiamkan selama 30 menit. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati. *Plate* dipasang pada alat elektroforesis dan berikutnya *buffer* PBS dituangkan pada *chamber* elektroforesis.

Limabelas µl sampel ditambah 15 µl Non RSB (*Non Reducing Sample Buffer*) dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf, kemudian dipanaskan dalam pemanas air pada suhu 100° C selama 3 menit. Setelah dingin sampel diambil sebanyak 15 µl dimasukkan dalam tiap-tiap sumur. Protein standar diperlakukan sama dengan sampel. Setelah itu anoda dihubungkan pada *reservoir* bawah dan katoda dihubungkan dengan *reservoir* atas. *Power supply* dihidupkan dengan arus listrik sebesar 30 mA, 130 V selama 1 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian ± 0,05 cm dari batas bawah plat gel. Plat dibuka dan gel diambil untuk dilakukan pewarnaan dan pencucian gel.

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan staining *Coomassie Blue R-250* selama 30–60 menit. Kemudian dilakukan penghilangan warna dengan merendam gel dalam larutan *destaining* dan digoyang secara otomatis sampai gel menjadi jernih dan hasil elektroforesis difoto atau discan (Aulani'am, 2005).

Isolasi protein *Insulin Like Growth Factor-I Complex* dengan Metode Elektroelusi

Elektroelusi dilakukan dengan memasukkan potongan band pada gel *Native-PAGE* ke dalam kantong selofan sepanjang kurang lebih 10 cm dengan tetap dijaga agar posisi gel tidak melengkung. Bagian atas dan bawah selofan diikat dengan benang, kemudian dimasukkan alat elektroforesis horizontal (Bio-Rad). Alat elektroforesis *Bio-Rad* diisi dengan *buffer* sebanyak 500 ml dalam posisi buffer melebihi kawat. *Running* elektroelusi dilakukan pada kondisi 150 Volt, 40 mA selama 2 jam. Cairan

hasil elektroelusi ditampung dalam tabung Eppendorf, disimpan pada suhu -70°C , siap dipakai untuk penelitian berikutnya.

Spesifisitas Protein *Insulin Like Growth Factor-I* Complex dengan Metode *Western Blot*

Western Blot dilakukan pada alat pentransfer sistem semi kering atau basah. Transfer dilakukan pada membran *PVDF* (*polyvinilidene difluorida*) atau *nitrosellulose* (NC). Tahapan kerja western blot adalah sebagai berikut: preparasi protein antigen, penyiapan *Native-PAGE* penyiapan membran dan transfer protein pada membran, inkubasi dengan antibodi (primer dan sekunder). Gel hasil elektroforesis dicuci dengan akuades dan direndam dalam *buffer blotting*. Membran NC atau PV dipotong dan dibasahi dengan PBS selama 10 menit pada suhu kamar. Sebelum dilakukan proses *blotting*, membran direndam terlebih dahulu. *Black side* (Spon) dan kertas saring direndam dalam *blotting buffer* dan disusun dengan urutan dari atas ke bawah sebagai berikut: spon – kertas saring 6 lembar – gel – membran NC – kertas saring 9 lembar – spon (*Red side*). Selanjutnya transfer dilakukan semalam pada 25 Volt pada suhu 4°C .

Membran di-*blocking* dalam PBS-T skim milk 5% selama 1 jam sambil digoyang. Kemudian dicuci 3×5 menit dengan PBS-T dan diinkubasi dengan antibodi primer (*anti-IGF-I Complex standard*) yang telah diencerkan dalam PBS-T Skim 5% (1:200) selama semalam pada suhu 4°C dan dicuci lagi 3×5 menit dengan TBS. Selanjutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder AP (Conjugated (1:2500 dalam TBS) selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS-T selama 4×5 menit, ditambah substrat *Western Blot* dalam ruang gelap ke membran selama semalam atau sampai terlihat warna *band*, dicuci dalam akuades (Rantam, 2003).

Aplikasi protein *IGF-I Complex* Plasma Seminalis Kambing pada Tikus Putih Jantan

Tikus putih jantan sebanyak 30 ekor dibagi secara acak menjadi tiga kelompok:

- Kelompok I : disuntik dengan NaCl fisiologis
- Kelompok II : disuntik dengan *IGF-I Complex* 100 ng/ekor/im/minggu selama 6 minggu
- Kelompok III : disuntik dengan *IGF-I Complex* 100 ng/ekor/im/2 minggu selama 6 minggu

Setelah 6 minggu tikus putih jantan dibunuh kemudian testisnya diambil dilakukan pemeriksaan histologis dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). Dihitung jumlah

spermatisit I dan spermatisit II dalam tubulus (tiga tubulus kemudian dihitung rata-ratanya).

Analisis Data

Bagian penelitian yang merupakan penelitian eksploratif, tidak ada analisis statistik, data disajikan secara deskriptif. Data persentase jumlah spermatisit I dan spermatisit II diuji dengan *Anava* pada tingkat kepercayaan 5%, bilamana ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (Santoso dan Fandy, 2001).

HASIL

Sebagai bahan untuk identifikasi dan isolasi *IGF-I Complex*, semen ditampung dari pejantan kambing peranakan etawa yang berumur 3–5 tahun, kondisi sehat dan mempunyai libido tinggi. Sebagai dasar untuk menentukan kelayakan semen segar untuk diisolasi proteinnya, yaitu dilakukan pemeriksaan kualitas dan kuantitas yang meliputi pemeriksaan makroskopis (warna, bau, konsistensi, pH, volume) dan pemeriksaan mikroskopis (konsentrasi, motilitas massa, persentase motilitas individu yang progresif dan persentase hidup spermatozoa). Semen yang memiliki persentase motilitas individu $\geq 70\%$, hidup $\geq 70\%$ dengan motilitas massa +++ yang akan digunakan sebagai sampel penelitian, hal tersebut karena konsentrasi protein *IGF-I* berkorelasi dengan konsentrasi, morfologi dan persentase motilitas spermatozoa yang progresif (Macpherson *et al.*, 2002). Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar dari kambing jantan peranakan etawa dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Kualitas dan Kuantitas Segar Kambing Peranakan Ettawa untuk Isolasi dan Identifikasi *IGF-I Complex*

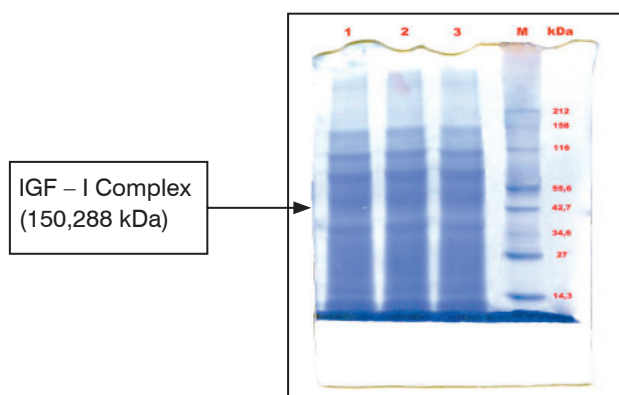
Parameter	Karakter
Warna	Putih kekuningan
Bau	Khas
Konsistensi	Kental
PH	7,00
Volume (ml)	1,1
Konsentrasi (juta) spz	3900×10^6
Motilitas massa	+++
Motilitas individu	Progresif ($89 \pm 8,16\%$)
Hidup	$92,30 \pm 8,49\%$

Berdasarkan hasil penilaian kualitas semen segar kambing peranakan etawa yang ditampung (Tabel 1) dapat disimpulkan bahwa semen segar kambing yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam proses isolasi protein plasma seminalis. Hal ini sesuai

dengan apa yang dikemukakan oleh Toelihere (1985) bahwa semen segar yang memenuhi persyaratan untuk diproses lebih lanjut harus memiliki persentase motilitas minimal 70%, persentase hidup minimal 70% dan konsentrasi minimal 600 juta permililiter semen.

Identifikasi Protein Plasma Seminalis Kambing dengan *Native-PAGE*

Plasma seminalis kambing dalam proses elektroforesis dengan *Native-PAGE* menghasilkan 7 *band*. Berdasarkan urutan berat molekulnya ketujuh *band* tersebut berturut-turut adalah *band* pertama (Mr 150,288 kDa), *band* kedua (Mr 103,486 kDa), *band* ketiga (Mr 76,155 kDa), *band* keempat (Mr 53,249), *band* kelima (Mr 35,378 kDa), *band* keenam (Mr 14,099kDa) dan *band* ketujuh (Mr 11,492 kDa) (Gambar 1).

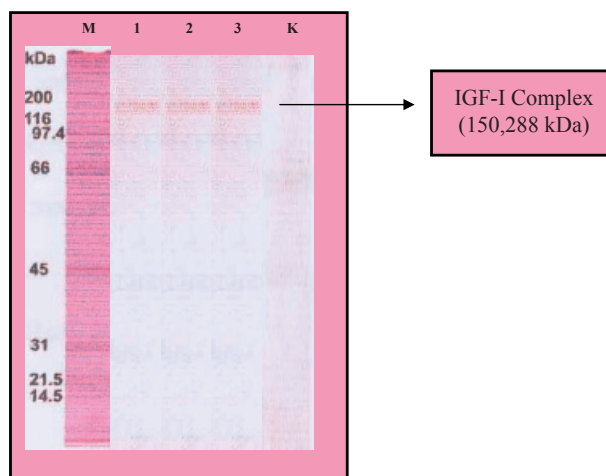


Gambar 1. Gel hasil analisis dengan *Native-PAGE* 12% pada plasma seminalis kambing (M: marker, 1, 2, 3: sampel plasma seminalis kambing)

Spesifisitas protein *IGF-I Complex* menggunakan *Western Blot*

Untuk mengetahui bahwa molekul *IGF-I Complex* plasma seminalis kambing peranakan ettawa yang mempunyai BM 158,288 kDa bereaksi spesifik dengan anti-*IGF-I Complex* monoklonal (standard) dilakukan dengan *Western Blot*. Hasil uji *Western Blot* nampak seperti Gambar 2, bahwa anti-*IGF-I Complex* mengenali *IGF-I Complex* dengan BM 150,288 kDa. Hasil *Western Blot* mengindikasikan bahwa molekul *IGF-I Complex* plasma

seminalis kambing peranakan ettawa berikatan spesifik dengan anti-*IGF-I Complex* pada *band* protein.



Gambar 2. Uji *Western Blot* molekul *IGF-I Complex* plasma seminalis kambing peranakan ettawa terhadap anti-*IGF-I Complex*

Keterangan:

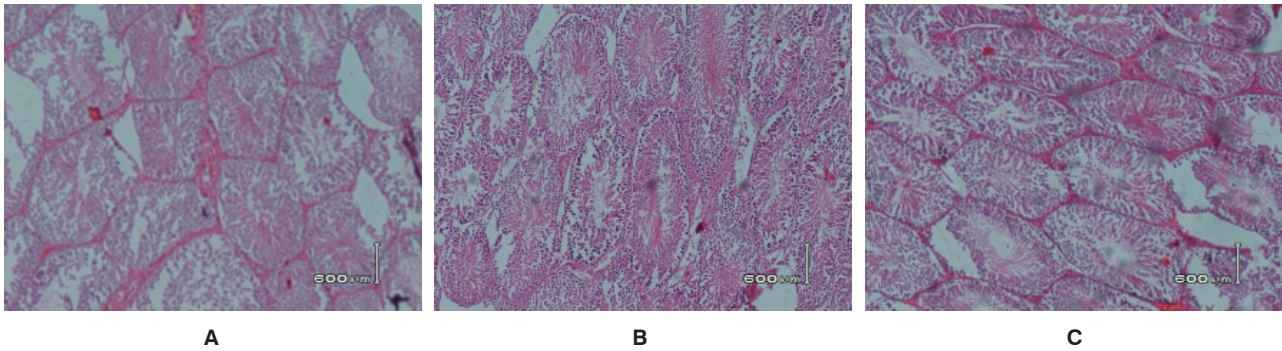
Protein *IGF-I Complex* berikatan spesifik dengan anti-*IGF-I Complex*

Hasil Aplikasi Protein *IGF-I Complex* Plasma Seminalis Kambing pada Tikus Putih

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Jumlah Spermatosit I dan Spermatosit II pada Tubulus Testis

Jenis sel	Kontrol	Perlakuan I	Perlakuan II
Spermatosit I	85	88	105
	90	95	125
	92	99	115
	86	90	107
	88	92	118
	86	100	120
Rataan $\pm$ SD	87,83 $\pm$ 2,7 ^a	94,00 $\pm$ 4,86 ^b	115,00 $\pm$ 7,72 ^c
Spermatosit II	95	98	124
	98	100	130
	105	109	145
	98	102	120
	100	104	126
	108	99	138
Rataan $\pm$ SD	100,67 $\pm$ 4,89 ^a	102,00 $\pm$ 4,05 ^b	130,05 $\pm$ 9,38 ^c

Keterangan: superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)



Gambar 3. Gambaran histologi testes tikus putih (A kontrol, B perlakuan I, C perlakuan II)

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa pada perlakuan yang berbeda menghasilkan pola perbedaan yang nyata pada jumlah spermatosit I maupun jumlah spermatosit II. Pengamatan pada perlakuan II (perlakuan penyuntikan protein *IGF-I Complex* pada tikus putih dengan dosis 100 ng/2 mg/ selama 6 mg) menghasilkan jumlah spermatosit I maupun II paling tinggi, yaitu $115,00 \pm 7,72$ dan $130,05 \pm 9,38$, sedangkan pada kelompok kontrol jumlah spermatosit I dan spermatosit II paling rendah yaitu $87,83 \pm 2,7$ dan $100,67 \pm 4,89$. Uji Anava terhadap jumlah spermatosit I dan spermatosit II menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol, perlakuan I dan perlakuan II. Dengan uji Jarak Berganda Duncan jumlah spermatosit I dan II yang tertinggi pada perlakuan II. Hal ini berarti bahwa dosis perlakuan II adalah dosis yang paling tepat untuk meningkatkan jumlah spermatosit I maupun jumlah spermatosit II. Hasil penelitian tersebut sesuai dengan penelitian Macpherson *et al.* (2002) bahwa protein *IGF-I* selain berfungsi sebagai steroidogenesis juga berfungsi pada spermatogenesis.

PEMBAHASAN

Sebagai dasar untuk menentukan kelayakan semen segar untuk diisolasi proteinnya adalah hasil pemeriksaan kualitas semen awal. Penilaian kualitas semen segar baik secara makroskopis maupun mikroskopis yang dilakukan segera setelah penampungan sangat penting artinya sebelum melakukan proses lebih lanjut. Kualitas semen yang baik menggambarkan pentingnya peran protein dalam plasma seminalis terhadap fungsi spermatozoa. Hal tersebut juga dibuktikan oleh Macpherson *et al.* (2002), bahwa ada korelasi positif antara kadar protein *IGF-I* plasma seminalis kuda dengan konsentrasi, morfologi dan motilitas spermatozoa sehingga dapat disimpulkan bahwa semen

yang mempunyai kualitas baik mempunyai korelasi positif dengan kadar protein *IGF-I*.

Plasma seminalis secara biokimia mengandung senyawa organik dan anorganik. Salah satu senyawa tersebut adalah protein (Garner dan Hafez, 2000). Protein dapat dipisahkan dengan cara elektroforesis. Elektroforesis dengan larutan detergen tidak hanya memisahkan berbagai subunit protein secara individu akan tetapi juga memberikan kemungkinan untuk memperkirakan berat molekul suatu protein. Hal ini karena detergen yang dipakai, yaitu *Sodium Dodecyl Sulfat* (SDS) mengelilingi molekul protein menetralkan seluruh muatan alamiah dan merusak struktur sekunder dan tertier. Akibatnya molekul-molekul protein terpisahkan menurut ukurannya masing-masing ketika melewati pori-pori gel elektroforesis, protein-protein yang lebih kecil bergerak lebih cepat daripada molekul protein yang lebih besar (Dorothy, 1993).

PAGE merupakan standard metode pengujian terhadap berat molekul (BM) protein, struktur subunit dan kemurnian protein. Protein adalah molekul yang amfoterik mengandung kedua grup karboksil negatif dan grup amino positif. Protein dalam *Native-PAGE* akan bermigrasi sesuai dengan berat molekul (BM) dan akan terkonsentrasi pada *band* pada gel (Rantam, 2003).

Pengujian Immunoblotting melalui metode *Western Blot* dengan menggunakan anti *IGF-I Complex* monoklonal ternyata yang muncul pada saat melakukan pemeriksaan melalui *elektroforesis Native-PAGE* adalah benar *band IGF-I Complex* dan bukan protein lain. Anti-*IGF-I Complex* yang digunakan sebagai antibodi primer akan berikatan dengan *band IGF-I Complex* sebagai antigennya. Anti-rabbit IgG AP Conjugate sebagai antibodi sekunder akan mengikat antibodi primer. *Western Blue solution* akan berikatan dengan antibodi sekunder sehingga menghasilkan *band* yang berwarna keunguan pada membran.

Hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa reseptor *IGF-I Complex* sesuai dengan penelitian Macpherson *et al.*, 2002, protein *IGF-II* selain berfungsi sebagai steroidogenesis juga berfungsi pada spermatogenesis. *IGF-I Complex* akan menstimulasi hipotalamus, yang kemudian merangsang hipofisis anterior. *FSH (Follicle Stimulating Hormone)* atau *ICSH (Interstitial Cell Stimulating Hormone)* akan berpengaruh pada pembentukan sel-sel pada tubulus seminiferus dan *LH (Luteinizing Hormone)* berpengaruh pada sel Leydig sehingga akan menghasilkan hormon testosteron yang akhirnya akan berfungsi pada tahap akhir spermatogenesis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan sebagian dari hasil penelitian yang dibiayai oleh Proyek Insentif Riset Dasar tahun 2007. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih.

KEPUSTAKAAN

- Anastasia D, Mistry J, Krishna RG dan Khosravi J, 2000. Immunoassay of Insulin Like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP-3) New Means to Quantifying IGFBP3 Proteolysis. *J. Endocrin and Metabolis*. 85: 232–30.
- Aulani'am, 2005. Protein dan Analisisnya. Citra Mentari Group, Malang. 53–85.
- Balboni MR, Fayrer RA, and Hosken, 1998. Possible Mechanism of Mammalian Imunocontraception. *J. Reprod Immunology*. 46: 103–124.
- Baxter RC, 1990. Circulating Levels and Molecular Distribution of the Acid labile (Alpha) Subunit of the High Molecular Weight Insulin Like Growth Factor Binding Protein Complex. Australia. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 70(5).
- Birkenmeier G, Glander H.J, Kratzsch, and Weisbrich,C, 1996. Insulin Like Growth Factor I and Alpha-2 Macroglobulin in Seminal Plasma. *Human Reprod*. 11(11): 2454–60.
- Clenmons DR dan Jones JL, 1995. Insulin Like Growth Factor and Their Binding Protein Biological Action. *Endocrinology*. Rev. 16: 3–34.
- Donald MH, Andrew J, Kouba, Brett R, Lackey, William R, Boone, and Sandra LG, 1998. Identification of Insulin Like Growth Factor I in Bovine Seminal Plasma and Its Receptor on Spermatozoa: Influence on Sperm Motility. 59: 330–337.
- Donald's, Mc, 2003. Veterinary Endocrinology and Reproduction. Fifth Edition. Edited by: Maurico H Pineda, Michael p Dooley. Hal: 154–225, 265, 325, 447.
- Dorothy ES, 1993. Intisari Biokimia. Binarupa Aksara. Jakarta. 196–205.
- Garner dan Hafez ESE, 2000. Reproduction in Farm Animals. 7th Edition. Philadelphia, Baltimore, New York, London.
- Glander HJ, Kratzsch J, Wesbrich C, Birkenmeier G, 1996. Insulin Like Growth Factor – I and alpha 2 macroglobulin in seminal plasma. *Human. Repod*. 11(11): 2454–60.
- Harper R, 1988. Biochemistry. The United State of America. New York. 130–167.
- Kostecka Z dan Blanovec J, 1999. Insulin Like Growth Factor Binding Protein and Their Fuctions (Minireview). *Endocrine Regulations*. 33: 90–94.
- Macpherson ML, Simmen RCM, Simmen EA, Hernandes J, Sheerin BR, Varner DD, Loomis P, Cadario ME, Miller CD, Brinsko SP, Rigby S, and Blanchard TL, 2002. Insulin Like Growth factor I and Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2 and 5 Equine Seminal Plasma: Association with Sperm Characteristics and Fertility. *Biology of Reproduction*. 67: 648–54.
- Minelli A, Moroni M, dan Castellini C, 2001. Isolation and Purification of the IGF-I Protein Complex From Rabbit Seminal Plasma: Effect on Sperm Motility and Viability. *Exp Zool*. 1: 290 (3): 273–90.
- Rantam FA, 2003. Metode Imunologi. Airlangga University Press, Surabaya. 145–147.
- Roser JF dan Hess MF, 2001. The Effect of Age and Fertility Status on Plasma and Intratesticular Insulin Like Growth Factor I Concentration in Stallion. *Theriogenology*. 56: 723–33.
- Santoso dan Fandy, 2001. Riset pemasaran. Konsep dan Aplikasi dengan SPSS. Gramedia, Jakarta.
- Toelihere MR, 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung. 98–254.

Reviewer: **Prof. Dr. Sutiman B. Sumitro**